فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۴

اثرات آنتی‌اکسیدانی و تحریک‌کنندگی ایمنی عصاره جلبک سارگاسوم *Sargassum angustifolium* بر بچه ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio*

سراج بیتا[۱]*، نازنین قربانی رنجبری[۲]

تاریخ دریافت: دی ۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۴

چکیده

در این مطالعه، اثرات سطوح مختلف عصاره جلبک *Sargassum angustifolium* بر توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی و سیستم ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی (۱۲/۲۵± ۴۳/۸۵ گرم) طی مدت سه هفته پرورش مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا عصاره ۱۰ درصد جلبک سارگاسوم در آب دو بار تقطیر شده، تهیه شد. سپس از عصاره مذکور در سه سطح مختلف شامل ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪ عصاره جلبک سارگاسوم در هر ۱۰۰ سی‌سی آب پرورشی، برای حجم ۱۰ لیتری آکواریوم تهیه شد (در سه تکرار) و در هر آکواریوم ۵ قطعه ماهی قرار داده شد. یک تیمار شاهد (فاقد عصاره) نیز در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری از ماهیان برای بررسی فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های ایمنی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام شد. نتایج نشان داد که فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون در تیمار شاهد با بقیه تیمارها و همچنین بین روزهای مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای ۵٪ و ۱۰٪ عصاره جلبک در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$). طبق نتایج، تیمار ۱۰٪ عصاره جلبک در مقایسه با سایر تیمارها بیش‌ترین اثرات آنتی‌اکسیدانی و تحریک کنندگی ایمنی را بر ماهی کپور معمولی داشت، به طوری که بیش‌ترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (۸/۵۶±۰/۶۵μmol/g) در تیمار ۱۰٪ عصاره در آخرین روز نمونه‌برداری مشاهده شد. از بین شاخص‌های ایمنی تعداد کل گلبول-های سفید در تیمار ۱۰٪ عصاره جلبک و فعالیت لیزوزیم در تمام تیمارهای عصاره جلبک با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$).

واژگان کلیدی: *جلبک سارگاسوم، توان دفاع آنتی اکسیدانی، محرک ایمنی، کپور معمولی.*

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.
۲- کارشناس ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
* نویسنده مسئول: serajbita@yahoo.com

مقدمه

در سال‌های اخیر آبزی‌پروری در بسیاری از نقاط جهان در حال افزایش است. از مهم‌ترین مشکلاتی که پرورش دهندگان ماهی با آن مواجه هستند، کاهش میزان زنده‌مانی خصوصاً در مراحل اولیه زندگی است. بنابراین تقویت و ارتقای سیستم ایمنی و دفاعی بدن ماهیان به ویژه در گونه‌های پرورشی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان است (Magnadottir, 2006).

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها تاریخچه‌ای طولانی دارد. استفاده از آن‌ها از زمان‌های بسیار دور به ویژه در کشورهای شرق آسیا مرسوم بوده است. اما ظهور آنتی‌بیوتیک‌ها در قرن بیستم باعث کاهش کاربرد آن‌ها شد. اثرات مضر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بر سلامت انسان و حیوان، کیفیت محصول و ایمنی پژوهشگران را در چند دهه اخیر به رشته‌های گیاه شیمی و گیاه درمانی علاقه‌مند کرده است (Makkar et al., 2009). به علاوه با توجه به روش استفاده غیرسیستمیک از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزیان، با ایجاد مشکلات زیست‌محیطی و آسیب به طبیعت، اثرات منفی بیش‌تر و مشهودتری دارد، از این‌رو معرفی مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در بهداشت آبزیان شاید ضروری‌تر از سایر صنایع دامی باشد (Hahm et al., 2001). یکی از این مواد جایگزین، محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی از جمله جلبک‌های دریایی هستند که می‌توانند نقش بسیار مهمی را در افزایش پاسخ ایمنی و جلوگیری از بروز بیماری‌ها در آبزیان و انواع سیستم‌های پرورشی آبزیان داشته باشند. این محرک‌ها از طریق تقویت توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی و سیستم ایمنی غیراختصاصی مقاومت ماهی را در برابر بیماری‌ها افزایش می‌دهند (فاطمی و میرزرگر، ۱۳۸۶).

گیاهان یا محصولات جانبی آن‌ها حاوی چندین نوع فنول، پلی‌فنول، آلکالوئید، کوئینون، ترپنوئید، بتاکاروتن و ترکیبات پلی‌پپتیدی هستند که بسیاری از این‌ها می‌توانند به طور مؤثری جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای شیمیایی، واکسن‌ها و سایر ترکیبات مصنوعی باشند (Harikrishnan et al., 2011). با پیشرفت تکنولوژی برخی اثرات دارویی و درمانی این جلبک‌ها نیز آشکار شده و مزیت‌های استفاده طبیعی این جلبک‌ها در مقابل داروهای سنتزی به خوبی مشخص شده است (Smith, 2004). برخی مطالعات نشان

داده‌اند استفاده از جلبک‌های خشک شده به عنوان محرک ایمنی در صنعت آبزی پروری باعث بهبود پاسخ‌های فیزیولوژیک نسبت به استرس و بیماری می‌شود (Jaime-Ceballos et al., 2005).

جلبک سارگاسوم جزو گیاهان دریایی و متعلق به جلبک‌های قهوه‌ای بوده که عمدتاً در محدوده‌های بین جزر و مدی و همچنین در مناطق کم عمق محدوده‌های زیر جزر و مدی سواحل دریاها بر روی بسترهای صخره‌ای رویش دارد. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در جلبک‌ها سبب بهبود سیستم ایمنی و وضعیت اکسیدان/آنتی‌اکسیدان آبزیان در آب‌ها می‌شوند (بیتا و همکاران، ۱۳۹۴). توان دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان پرورشی محدود است. با افزایش آلودگی آب و تحریک سیستم اکسیداتیو، بهبود وضعیت آنتی‌اکسیداتیوی ماهی امری ضروری است (Nakano et al., 1999). از این رو هر تلاشی برای افزایش توان دفاعی این سیستم می‌تواند منجر به بهبود وضعیت سلامتی ماهی شود.

مطالعات متعددی در زمینه خواص آنتی‌اکسیدانی، حذف اکسی‌رادیکال‌ها و توانایی چلاته کنندگی آهن در جلبک‌های دریایی در شرایط آزمایشگاهی توسط پژوهشگران مختلف انجام شده است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲؛ Chew et al., 2008؛ Wang et al., 2009؛ Luo et al., 2010؛ Horincar et al., 2011؛ Farasat et al., 2013). همچنین استفاده از جلبک‌ها به عنوان محرک سیستم ایمنی در افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است (سلیقه‌زاده و همکاران، ۱۳۹۴؛ Watanuki et al., 2006؛ Promya and Chitmanat, 2011)، بنابراین با توجه به اثرات گیاهان و جلبک‌های دریایی بر توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی و تقویت کنندگی سیستم ایمنی بدن ماهی، مطالعه حاضر اولین مطالعه در ایران با هدف بررسی اثر عصاره جلبک سارگاسوم بر تغییرات آنزیم‌های دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی و تحریک سیستم ایمنی، از طریق افزودن عصاره به محیط آب پرورشی ماهیان کپور معمولی است.

مواد و روش‌ها

تهیه و شرایط نگهداری ماهیان

تعداد ۲۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی ۱۲/۲۵±۴۳/۸۵ گرم (میانگین ± انحراف معیار) از استخرهای پرورش ماهی شهرستان شوشتر تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی بخش بهداشت

آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. قبل از ذخیره‌سازی بچه ماهیان، کلیه آکواریوم‌ها با استفاده از آب شهر و مواد شوینده کاملاً ضدعفونی و شست و شو شده، سپس خشک و آب‌گیری شدند. عمل کلرزدایی آب از طریق هوادهی صورت گرفت. سپس ذخیره‌سازی با ۵۰ قطعه ماهی در هر آکواریوم (۱۰۰ لیتری) انجام شد. دوره سازش‌پذیری ماهیان یک هفته در نظر گرفته شد. در طول این مدت تغذیه بچه‌ماهیان با جیره غذایی تجاری بیومار (نروژ) به میزان ۳ درصد وزن بدن در ساعات ۸:۰۰، ۱۳:۰۰ و ۱۷:۰۰ انجام گرفت.

تهیه عصاره از سارگاسوم *Sargassum angustifolium*

برای تهیه عصاره آبی از جلبک سارگاسوم (*Sargassum angustifolium*) ابتدا جلبک‌های جمع آوری شده به مدت یک هفته در سایه قرارداده شدند تا خشک شوند. نمونه‌های خشک شده با استفاده از دستگاه خردکن، به شکل پودر در آورده شدند، سپس ۱۰ گرم پودر جلبک با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر در داخل ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتر همراه با مگنت، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد روی هیتر حرارت داده شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی با استفاده از کاغذ صافی واتمن (شمار ه ۱) فیلتر شد. عصاره به دست آمده برای استفاده‌های بعدی در یخچال (۴- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد (Singaravelu et al., 2007).

تیماربندی، نمونه‌برداری و سنجش فاکتورهای آنتی‌اکسیدان و ایمنی

پس از اتمام دوره سازش‌پذیری به منظور بررسی اثرات عصاره جلبک سارگاسوم در طی یک دوره ۲۱ روزه، ماهیان در ۴ تیمار شامل تیمار ۱ (تیمار شاهد): محیط آب فاقد عصاره جلبک سارگاسوم، تیمار ۲: محیط آب حاوی ٪۱ عصاره جلبک سارگاسوم (۱۰ میلی‌لیتر عصاره جلبک در یک لیتر آب پرورشی)، تیمار ۳: محیط آب حاوی ٪۵ عصاره جلبک سارگاسوم (۵۰ میلی‌لیتر عصاره جلبک در یک لیتر آب پرورشی) و تیمار ۴: محیط آب حاوی ٪۱۰ عصاره جلبک سارگاسوم (۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره جلبک در یک لیتر آب پرورشی)، هر کدام با ۳ تکرار، به تعداد ۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم ۱۰ لیتری تقسیم شدند. تثبیت شرایط فیزیکوشیمیایی آب از قبیل اکسیژن و pH، از طریق هوادهی و تعویض ٪۲۰ حجم آب هر ۴۸ ساعت یک‌بار

انجام می‌شد. بعد از هر بار تعویض آب، میزان عصاره جلبک سارگاسوم در هر آکواریوم مجددا تنظیم می‌شد (کلباسی و همکاران، ۱۳۹۱).

نمونه‌برداری از ماهیان جهت بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام شد. برای این کار ۳ قطعه ماهی از هر آکواریوم به صورت تصادفی انتخاب شد و پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۳۰۰ ppm)، با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری، خونگیری از ناحیه ساقه دمی برای بررسی فاکتورهای ایمنی انجام شد. همچنین برای بررسی وضعیت مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، بافت کبد ماهیان خارج شد و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این مطالعه از بین فاکتورهای ایمنی، فعالیت لیزوزیم بر اساس روش ارائه شده توسط Sahoo و همکاران (۲۰۰۵)، تعداد کل گلبول‌های سفید بر اساس روش Thrall (۲۰۰۴) به صورت دستی و با استفاده از لام هموسیتومتر و میزان ایمنوگلوبولین کل سرم بر اساس روش شرح داده شده توسط McEwan و همکاران (۱۹۷۰)، مورد سنجش قرار گرفت. همچنین اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر اساس روش Benzie و Strain (۱۹۹۶)، گلوتاتیون احیاء (GSH) بر اساس روش Ellman (۱۹۵۹)، کاتالاز (CAT) بر اساس روش Koroluk و همکاران (۱۹۸۸) و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت تجاری رندوکس (انگلستان) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج مربوط به سنجش فاکتورهای مختلف به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD)، بیان شده‌اند. اختلاف بین داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با آزمون واریانس دوطرفه، در نرم افزار SPSS نسخه ۲۱، بررسی شد و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها از پس‌آزمون Tukeys HSD، برای گروه‌بندی میانگین‌ها استفاده شد، و $P<۰/۰۵$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن نتایج تعیین شد. ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Microsoft Excel، نسخه ۲۰۱۳، انجام گرفت.

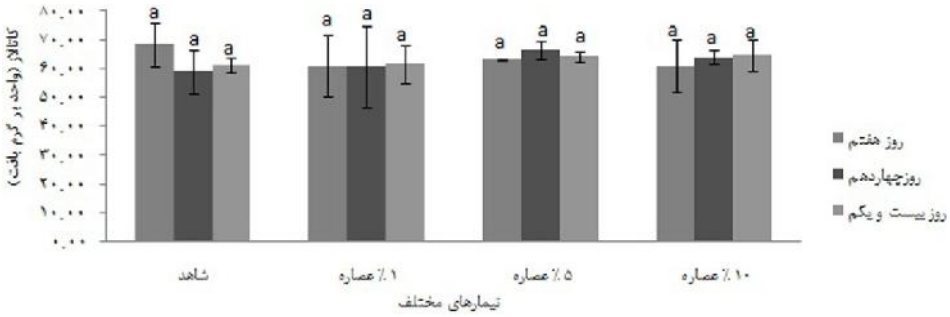
نتایج

شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی

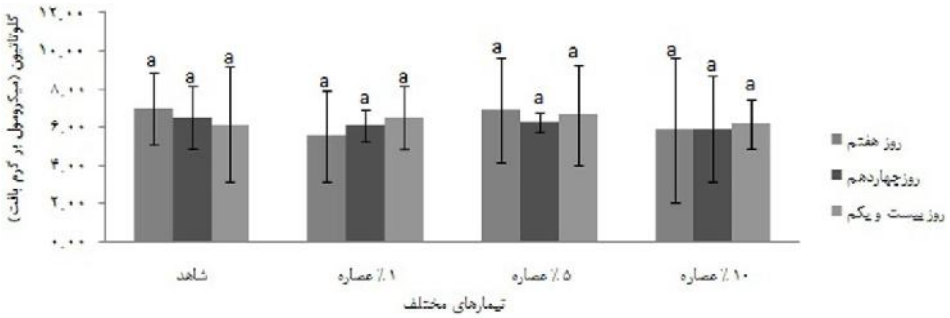
در این پژوهش فعالیت شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، گلوتاتیون، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در بچه ماهیان کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده از آن‌ها در شکل‌های ۱ تا ۴ ارائه شده است. طبق نتایج، میزان فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون در تیمارهای

مختلف عصاره جلبک در مقایسه با گروه شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). میزان فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون در روزهای مختلف نمونه‌برداری در تمام تیمارها دارای نوسانات افزایشی و کاهشی بود (شکل ۱ و ۲).

بیش‌ترین میزان فعالیت کاتالاز مربوط به تیمار ٪۱۰ عصاره جلبک و در روز ۲۱ نمونه‌برداری (۶۴/۸۰±۵/۴۸ IU/g) و کم‌ترین میزان آن مربوط به تیمار شاهد و در روز ۱۴ نمونه‌برداری (۵۸/۸۹±۷/۳۷ IU/g) بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان سطح فعالیت گلوتاتیون نیز همان‌طوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود به ترتیب در تیمارهای ٪۵ و ٪۱ عصاره جلبک (۶/۹۰±۲/۱۴μmol/g)، (۵/۵۵±۲/۲۴μmol/g) و در روز هفتم نمونه‌برداری بود.



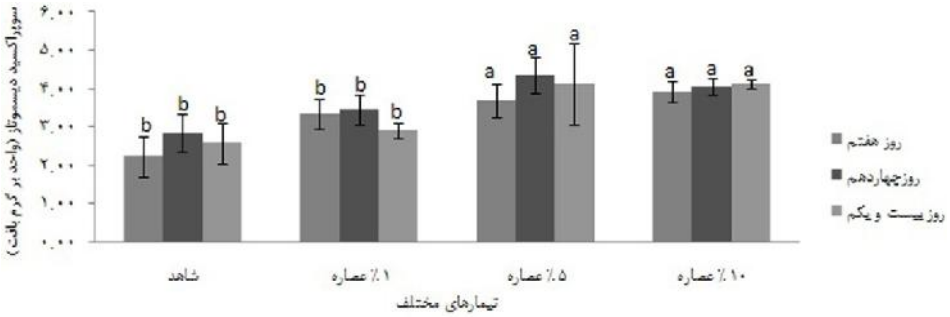
شکل ۱: تغییرات فعالیت کاتالاز در بافت کبد ماهی کپور معمولی تیمار شده با عصاره‌های جلبک سارگاسوم در روزهای مختلف نمونه‌برداری (حروف یکسان بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است)



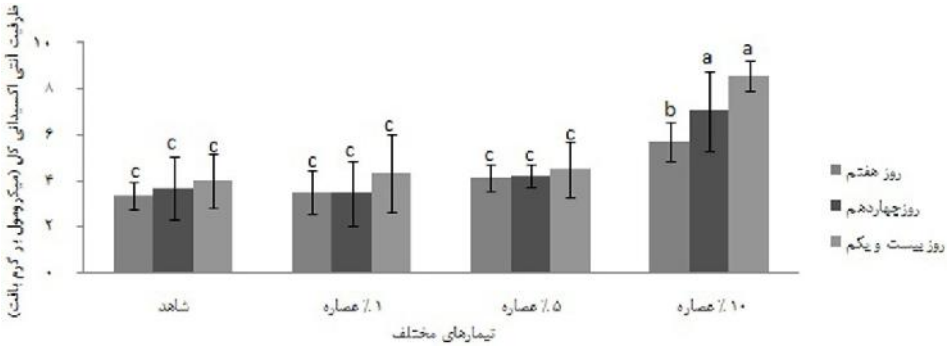
شکل ۲: تغییرات فعالیت گلوتاتیون در بافت کبد ماهی کپور معمولی تیمار شده با عصاره‌های جلبک سارگاسوم در روزهای مختلف نمونه‌برداری (حروف یکسان بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است)

سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای ٪۵ و ٪۱۰ عصاره جلبک در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). طبق شکل ۳، تغییرات سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، در طی روزهای مختلف نمونه‌برداری دارای نوسانات افزایشی و یا کاهشی بوده و از روند یکنواختی برخوردار نبود و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد و در روز هفتم نمونه‌برداری به دست آمد.

از نظر آماری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار ٪۱۰ عصاره جلبک سارگاسوم با تمام تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۵). طبق شکل ۴، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به ترتیب در تیمار ٪۱۰ عصاره جلبک و در روز ۲۱ (۸/۵۶±۰/۶۵µmol/g) و تیمار شاهد در روز هفتم (۳/۳۲±۰/۴۵µmol/g) حاصل شد.



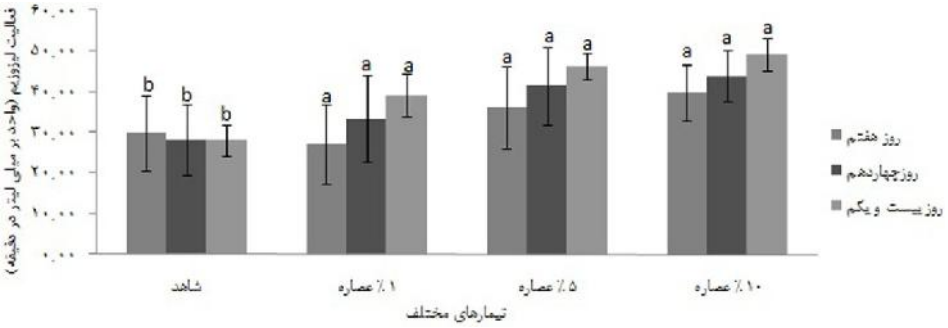
شکل ۳: تغییرات فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد ماهی کپور معمولی تیمار شده با عصاره‌های جلبک سارگاسوم در روزهای مختلف نمونه‌برداری (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است)



شکل ۴: تغییرات فعالیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در بافت کبد ماهی کپور معمولی تیمار شده با عصاره‌های جلبک سارگاسوم در روزهای مختلف نمونه‌برداری (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است)

شاخص‌های ایمنی

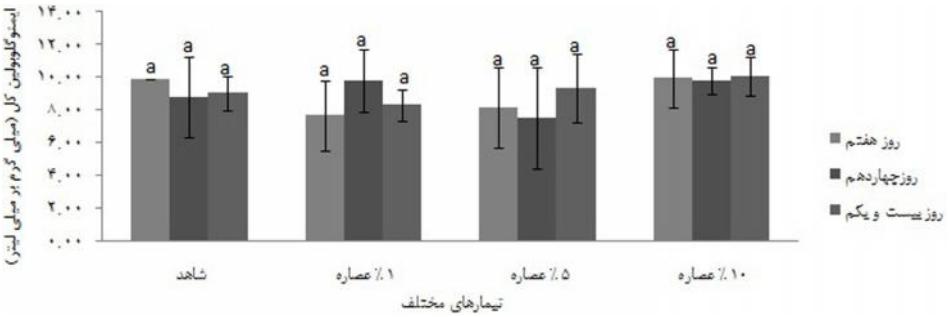
طبق شکل ۵ سطح فعالیت لیزوزیم به جز در تیمار شاهد در بقیه تیمارها با گذشت زمان روند افزایشی داشت. به طوری که بیش‌ترین میزان آن در تمام تیمارهای عصاره جلبکی بر خلاف تیمار شاهد در روز ۲۱ نمونه‌برداری به دست آمد.



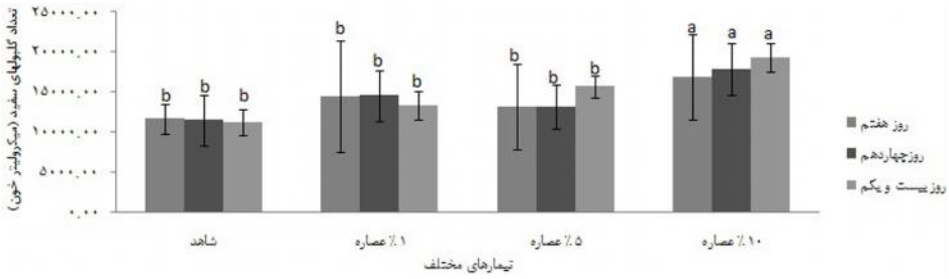
شکل ۵: تغییرات لیزوزیم سرم ماهی کپور معمولی تیمار شده با عصاره‌های جلبک سارگاسوم در روزهای مختلف نمونه‌برداری (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است)

میزان ایمنوگلوبولین کل در روزهای مختلف به جز در تیمار ۱۰٪ عصاره جلبک در بقیه تیمارها دارای نوسانات کاهشی و یا افزایشی بود (شکل ۶). به طوری که بیش‌ترین میزان آن نیز در همین تیمار و در روز ۲۱ نمونه‌برداری مشاهده شد (۱۰/۳۲±۱/۱۶mg/ml). طبق نتایج میزان ایمنوگلوبولین کل سرم در تمام تیمارها با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). همچنین میزان ایمنوگلوبولین در روزهای مختلف نمونه‌برداری در هر تیمار نیز اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۱۰٪ عصاره جلبک با تمام تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به این ترتیب که در تیمارهای شاهد و ۱٪ عصاره جلبک با گذشت زمان کاهش و در تیمارهای ۵٪ و ۱۰٪ عصاره جلبک با گذشت زمان افزایش یافت. البته این افزایش یا کاهش در روزهای مختلف در هر تیمار چندان چشمگیر نبود (شکل ۷).



شکل ۶: تغییرات مقادیر ایمنوگلوبولین کل سرم ماهی کپور معمولی تیمار شده با عصاره‌های جلبک سارگاسوم در روزهای مختلف نمونه‌برداری (حروف یکسان بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است)



شکل ۷: تغییرات گلبول‌های سفید ماهی کپور معمولی تیمار شده با عصاره‌های جلبک سارگاسوم در روزهای مختلف نمونه‌برداری (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است)

بحث

کاتالاز از آنزیم‌های کلیدی در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و گلوتاتیون به عنوان فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلول است که نقش مهمی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و سمیت‌زدایی داروها و مواد شیمیایی دارد (Stanic et al., 2006). در مطالعه حاضر با وجود این‌که در روزهای مختلف نمونه‌برداری میزان فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون دارای نوسانات کاهشی و افزایشی بود، اما بین تیمارهای مختلف عصاره جلبک با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در این مطالعه، کاهش فعالیت این آنتی‌اکسیدان‌ها احتمالا به دلیل مصرف شدن آن‌ها در فرآیند استرس اکسیداتیو (Govindasamy and Rahuman, 2012) و یا احتمالا کاهش نیاز به آنزیم فوق برای دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعال شدن سایر مسیرهای

آنتی‌اکسیدانی است (Ruas et al., 2008). افزایش میزان GSH بافت کبد، حاکی از غلبه بر استرس اکسیداتیو به واسطه گلوتاتیون-S-ترانسفراز (GST) است که با تبدیل شدن به GSH سبب افزایش سطح GSH می‌شود (Lee et al., 2012). در توافق با مطالعه حاضر، سایر پژوهشگران نیز اظهار داشتند که میزان کاتالاز و گلوتاتیون در بافت‌ها و سلول‌های گوناگون حیوانات، در مواجهه با عوامل خارجی القاء کننده استرس اکسیداتیو افزایش و یا کاهش یافته است (Oberdorster, 2004; Wang et al., 2009; Li et al., 2012).

سوپراکسید دیسموتاز اولین سد دفاعی در مقابل رادیکال‌های آنیون سوپراکسید است. در مطالعه حاضر سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ۵٪ و ۱۰٪ عصاره جلبک در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). افزایش در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز می‌تواند به دلیل فعال‌سازی مسیر آنتی‌اکسیدانی در اثر اضافه کردن عصاره جلبک سارگاسوم به محیط پرورشی بچه ماهیان کپور معمولی باشد، زیرا جلبک‌های دریایی به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی قادر به فعال‌سازی مسیر آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی هستند (Onofrejova et al., 2010).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان دهنده فعالیت کلیه آنتی‌اکسیدان‌های (آنزیمی و غیرآنزیمی) موجود در بدن است که در مواجهه با هر گونه عوامل مضر یا مفید، میزان هر کدام از آن‌ها ممکن است افزایش یا کاهش یابد. همچنین ممکن است مقدار برخی از این آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل فعال شدن آنتی‌اکسیدان‌های سطح اول، تغییر نکند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار ۱۰٪ عصاره جلبک نسبت به تمام تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵)، این افزایش احتمالا می‌تواند ناشی از خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک سارگاسوم باشد. پژوهش‌ها نشان داده است که ماکروجلبک‌های دریایی منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف همچون فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌ها هستند که می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری از اکسیداسیون داشته باشند. فنول‌ها گروه مهمی از ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و دیگر خواص زیستی هستند (Onofrejova et al., 2010). خاصیت آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنول‌ها مربوط به حلقه‌های فنولی است که این حلقه‌ها با حمله به رادیکال‌های آزاد سبب جذب

الکترون‌ها و از بین بردن برخی رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های پروکسی، آنیون سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شوند. مطالعات نشان داده است که ترکیب بسیاری از عصاره‌های گیاهی قادر به از بین بردن انواع رادیکال‌های آزاد شده در ماهیان هستند. همچنین ترکیبات موجود در جلبک‌های دریایی به طور مستقیم و غیرمستقیم از طریق فعال نمودن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی قادر هستند نقش حفاظتی برای موجود زنده داشته باشند (Farasat et al., 2013).

یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامتی و ایمنی ماهیان، سنجش پارامترهای خونی آن‌ها است (Fanouraki et al., 2007). لیزوزیم، آنزیمی است که توسط گلبول‌های سفید منتشر در بافت‌های مختلف و گردش خون ترشح می‌شود (سلطانی، ۱۳۸۷). سنجش میزان آن در سرم یا پلاسما، یکی از شاخص‌های زیستی مهم در آبزیان است. در مطالعه حاضر فعالیت لیزوزیم در تمام تیمارهای عصاره جلبک و تعداد کل گلبول‌های سفید در تیمار ۱۰٪ عصاره جلبک نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$)، افزایش قابل توجه و معنی‌دار در تعداد کل گلبول‌های سفید و سطح لیزوزیم در مطالعه حاضر حکایت از نقش عصاره جلبک سارگاسوم در تحریک سیستم ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی دارد. سلیقه‌زاده و همکاران در سال ۱۳۹۴ با بررسی اثر مکمل غذایی جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) بر شاخص‌های ایمنی گزارش کردند که این مکمل غذایی در سطح ۱۰٪ باعث افزایش شاخص‌های ایمنی کمپلمان و لیزوزیم در ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) شد. طی بررسی‌های فیتوشیمایی مشخص شد که جلبک‌های دریایی دارای ترکیبات فیتوشیمیایی متنوع مانند کربوهیدرات‌ها، آلکالوئیدها، استروئیدها، فنول‌ها، ساپونین‌ها، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها هستند (Mansuya et al., 2010) که این ترکیبات می‌توانند نقش مهمی در تحریک ایمنی داشته باشند. بنابراین وجود این ترکیبات مختلف با خواص تحریک کنندگی ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در جلبک سارگاسوم می‌تواند تا حدودی توجیه‌کننده افزایش فاکتورهای سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی در مطالعه حاضر باشد. قاسمی پیربلوطی و همکاران در سال ۱۳۹۰، افزایش فاکتورهای ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را ناشی از وجود ترکیبات

فیتوشیمایی مختلف مانند ترکیبات فنولی، استروئیدها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها در اسانس گیاهان دارویی پونه، مرزه و زرین‌گیاه، گزارش کردند.

ایمنوگلبولین‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها هستند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت می‌شوند. کاهش سطح آن‌ها، می‌تواند منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها شود (علیشاهی، ۱۳۸۸). اما میزان ایمنوگلوبولین کل سرم با وجود این‌که دارای نوسانات افزایشی و کاهشی بود، در تیمارهای مختلف عصاره جلبک از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵). در مطالعه‌ای که توسط Amar و همکاران (۲۰۰۴) صورت گرفت، با بررسی اثر جلبک سبز دونالی‌لا (*Dunaliella salina*) بر ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص شد که رنگدانه‌های کاروتنوئیدی موجود در جلبک سبب افزایش لیزوزیم و تعداد کل گلبول‌های سفید می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در این مطالعه میزان ایمنوگلوبولین کل بر خلاف مطالعه حاضر در تمام دوره روند افزایشی یکنواختی داشت. Guanghong و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند که عصاره ترکیبی چند گیاه دارویی سنتی چینی فعالیت فاگوسیتوز ماکروفاژها، محتوای پروتئین پلاسمای خون، گلوبولین و لیزوزیم سرم را افزایش می‌دهد که منجر به افزایش سطح ایمنی ماهی کپور می‌شود. در مطالعه دیگری که توسط علیشاهی (۱۳۸۸) انجام گرفت مشخص شد که عصاره گیاه دارواش (*Viscum album*) دارای اثرات تحریک ایمنی است و تولید آنتی‌بادی‌های سرمی را در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تحریک کرده، بین تعداد گلبول‌های سفید تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مقایسه آن با نتایج به دست آمده توسط سایر پژوهشگران می‌توان گفت که مواد محرک ایمنی با منشاء گیاهی و جلبک‌های دریایی بسته به روش عصاره‌گیری، شرایط آزمایش، گونه ماهی و غیره، ممکن است اثرات متفاوتی در تحریک سیستم ایمنی ماهی داشته باشند.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان چنین استدلال کرد که ترکیبات زیست‌فعال موجود در جلبک سارگاسوم به ویژه ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و همچنین تقویت سیستم ایمنی از اثرات سوء هر گونه عوامل

خارجی که ممکن است وارد سیستم پرورشی شود جلوگیری کنند. با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مشخص شد که عصاره جلبک سارگاسوم به تنهایی قادر است استرس اکسیداتیو را از طریق فعال‌سازی سوپراکسید دیسموتاز کاهش دهد. در نهایت نتایج نشان داد که عصاره جلبک سارگاسوم قادر است توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن بچه ماهی کپور معمولی را از طریق فعال‌سازی سوپراکسید دیسموتاز و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، افزایش دهد.

با توجه به نتایج این پژوهش درباره اضافه کردن عصاره جلبک سارگاسوم به محیط آب پرورشی بچه ماهیان کپور معمولی به نظر می‌رسد که استفاده از عصاره جلبک سارگاسوم در آب پرورشی ماهی کپور معمولی می‌تواند با فعال کردن توان دفاع آنتی‌اکسیدانی، افزایش سیستم ایمنی و تقویت آن راهکار مناسبی برای پیشگیری اثرات سوء احتمالی ناشی از تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها در نتیجه ورود آلاینده‌های سمی و سایر عوامل بیگانه به مزارع پرورشی و تاثیر آن بر سیستم ایمنی این ماهیان در مراحل اولیه زندگی باشد.

منابع

بیتا س.، مصباح م.، شهریاری ع. و قربانپور نجف‌آبادی م. ۱۳۹۴. تولید زیستی نانوذرات نقره با استفاده از جلبک *Sargassum angustifolium*. مجله علوم و فنون دریایی ایران، ۱۴(۱): ۹۰-۸۱.

حیدری م.، ذوالقرنین ح.، سخایی ن.، میرزایی ع. و موحدی‌نیا ع. ۱۳۹۲. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی عصاره هیدروالکلی برخی جلبک‌های سواحل خلیج فارس در استان بوشهر. مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۱(۱): ۶۲-۴۹.

سلطانی م. ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۵۰ص.

سلیقه‌زاده ر.، یاوری و.، موسوی س.م. و ذاکری م. ۱۳۹۴. اثر مکمل غذایی جلبک اسپیرولینا بر شاخص‌های ایمنی کمپلمان و لیزوزیم ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) انگشت‌قد. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۵(۱): ۵۰-۴۴.

علیشاهی م. ۱۳۸۸. مقدمه‌ای بر ایمنی‌شناسی آبزیان (ترجمه). انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز. ۴۰۰ص.

فاطمی س.ا. و میرزرگر س.س. ۱۳۸۶. فارماکولوژی کاربردی ماهیان (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران. ۱۲۳ص.

قاسمی پیربلوطی ع.، پیرعلی ا.، پیشکار غ.ر.، جلالی م.ع.، رئیسی م.، جعفریان دهکردی م. و حامدی ب. ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه داروهای گیاهی، ۲(۲): ۱۵۵- ۱۴۹.

کلباسی م.ر.، عبدالله‌زاده ا. و سالاری‌جو ح. ۱۳۹۱. تاثیرات نانوذرات نقره کلوئیدی بر جمعیت فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۷(۲): ۱۸۹-۱۸۱.

Amar E.C., Kiron V., Satoh S. and Watanabe T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish and Shellfish Immunology, 16(4): 57–37.

Benzie I.F.F. and Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70–76.

Chew Y.L., Lim Y.Y., Omar M. and Khoo K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. Food Science and Technology, 4: 1067–1072.

Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archive of Biochemistry

and Biophysics, 82: 70–77.

Fanouraki E., Divanach P. and Pavlidish M. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture Journal, 265: 294–304.

Farasat M., Khavari-Nejad R.A., Nabavi S.M.B. and Namjooyan F. 2013. Antioxidant properties of two edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. Jundi Shahpour Journal of Natural Pharmaceutical Products, 8(1): 47–52.

Govindasamy R. and Rahuman A.A. 2012. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Journal of Environmental Sciences, 24(6): 1091–1098.

Guanghong W.U., Yuan C.O., Shen M., Tang J., Gong Y.I., Dongme L.I., Sun F.F., Huang C. and Han X. 2007. Immunological and biochemical parameters in carp (*Cyprinus carp*) Qompsell feed ingredients for long term administration. Aquaculture Research, 38: 246–255.

Hahm D.H., Yeom M., Lee E.H., Shim I., Lee H.J. and Kim H.Y. 2001. Effect of *Scutellariae radix* as a novel antibacterial herb on the ppk (Polyphosphate kinase) mutant of *Salmonella typhimurium*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 11(6): 1061–1065.

Harikrishnan R., Balasundaram C. and Heo M.S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture, 317(1): 1–15.

Horincar V.B., Parfene G. and Bahrim G. 2011. Evaluation of bioactive compounds in extracts obtained from three Romanian marine algae species. Romanian Biotechnological Letters, 16(6): 71–78.

Jaime-Ceballos B., Villarreal H., Garcia T., Jar L.P. and Alfonso E. 2005. Effect of *Spirulina platensis* meal as feed additive on growth, survival and development in *Litopenaeus schmitti* shrimp larvae. Revista de Investigaciones Marinas, 26(3): 235–241.

Koroluk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G. and Tokarev V.E. 1988. A method for measuring catalase activity. Laboratornoe delo- Laboratory Practice, 1: 16–19.

Lee B.C., Kim K.T., Cho JG., Lee J.W., Ryu T.K., Yoon J.H., Lee S.H., Duong C.N., Eom I.C., Kim P.J. and Choi K.H. 2012. Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to TiO_2 nanoparticles. Molecular Cell Toxicology, 8: 357–366.

Li S., Shen Y., Xie A., Yu X., Qiu L., Zhang L. and Zhang Q. 2007. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* leaf extract. Green Chemistry, 9: 852–858.

Luo H.Y., Wang B., Yu C.G., Qu Y.L. and Su C.L. 2010. Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. Journal of Medical Plants Research, 4(18): 2557–2565.

Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20: 137–151.

Makkar H.P.S., Norvsambuu T., Lkhagvatseren S. and Becker K. 2009. Plant secondary metabolites in some medicinal plants of Mongolia used for enhancing animal health and production. Tropicultura, 27: 159–167.

Mansuya P., Aruna P., Sridhar S., Kumar J.S. and Babu S. 2010. Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of selected seaweeds from Gulf of Mannar Region. Journal of Experimental Science, 1(8): 23–26.

McEwan A.D., Fisher E.W., Selman I.E. and Penhale W.J. 1970. A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. International Journal of Clinical Chemistry, 27: 155–163.

Nakano T., Kanmuri T. and Sato M. 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. Biochimstry Biophysical Acta, 1426: 119–125.

Oberdorster E. 2004. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile Largemouth Bass. Environmental Health Perspectives, 112: 1058–1062.

Onofrejova L., vasickova J.V., Klejdus B., Stratil P., Misurcova L., Kracmar S., Kopecky J. and Vacek J. 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solidphase extraction techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51: 464–470.

Promya J. and Chitmanat C. 2011. The effects of *Spirulina platensis* and *Cladophora* algae on the growth performance, meat quality and immunity stimulating capacity of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). International Journal of Agriculture and Biology, 13(1): 77–82.

Ruas C.B.G., Carvalho C.D.S., Araujo H.S.S., Espindola, E.L.G. and Fernandes M.N. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated

river. Ecotoxicology Environmental Safety, 71: 86–93.

Sahoo P.K., Kumari J. and Mishra B.K. 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. Journal of Applied Ichthyology, 21(2): 151–155.

Singaravelu G., Arockiamary J.S., Ganesh Kumar V. and Govindaraju K. 2007. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 57: 97–101.

Smith A.J. 2004. Medical and pharmaceutical applications of seaweed natural products-a review. Journal of Applied Phycology, 16: 245–262.

Stanic B., Andric N., Zoric S., Grubor-Lajsic G. and Kovacevic R. 2006. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 65(3): 395–402.

Thrall M.A. 2004. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wilkins, USA. 402P.

Wang B., Zhang W., Duan X. and Li X. 2009. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). Food Chemistry, 113(4): 1101–1105.

Watanuki H., Ota K., Tassakka A.C.M.A.R., Kato T. and Sakai M. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 258(1): 157–163.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 4, Winter 2016

Antioxidant and immune-stimulating effects of *Sargassum angustifolium* extract on the common carp (*Cyprinus carpio*) juvenile

Seraj Bita[1]*, Nazanin Ghorbani Ranjbari[2]

Received: January 2016 Accepted: February 2016

Abstract

In this study, the effects of different concentrations of *Sargassum angustifolium* extract on the immune system and antioxidant defense mechanism of the common carp juvenile (43.85±12.25g) were investigated during a three weeks culture period. For this experiment first a stock solution of 10% sargassum seaweed was prepared by adding 10 grams of dried powder of sargassum to 100mL of double distilled water. Four aquariums each containing 10 liters of water and five fish were set up as treatments and control. Then concentrations of 1%, 5% and 10% of the sargassum extract was prepared in treatment aquariums by adding proportional volumes of the stock solution. Sampling of fish was conducted on days 7, 14 and 21 for measurement of antioxidant enzymes and immune indexes. The results revealed that the activity of catalase and glutathione in all samples taken at different days of the experiment did not show any significant differences with control group ($P>0.05$). The Superoxide dismutase activity level in 5% and 10% treatments demonstrated a significant increase compared to the control group ($P<0.05$). Based on the results, the 10% treatment had the highest immune stimulation and antioxidant effect on the fish compared to the other treatments by showing the highest antioxidant capacity (8.56 ± 0.65 µmol/g) at the final day of the experiment. Among the immune indices, the total number of white blood cells in 10% treatment and the lysozyme activity in all treatments showed a significant increase ($P<0.05$) compared to the control treatment.

Key words: *Sargassum Algae, Antioxidant Defense Capacity, Immune-Stimulant, Common Carp*.

1- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
2- M.Sc in Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.
*Corresponding Author: serajbita@yahoo.com